

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-207895

(43)公開日 平成5年(1993)8月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12Q 1/32		6807-4B		
	1/26	6807-4B		
// C12Q 1/54		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-25539

(22)出願日 平成4年(1992)8月31日

(31)優先権主張番号 特願平3-308580

(32)優先日 平3(1991)9月11日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 591262012

藤村 有信

愛知県一宮市今伊勢町馬寄舟入1-1 コ
ーブ野村C棟1111号

(72)発明者 藤村 有信

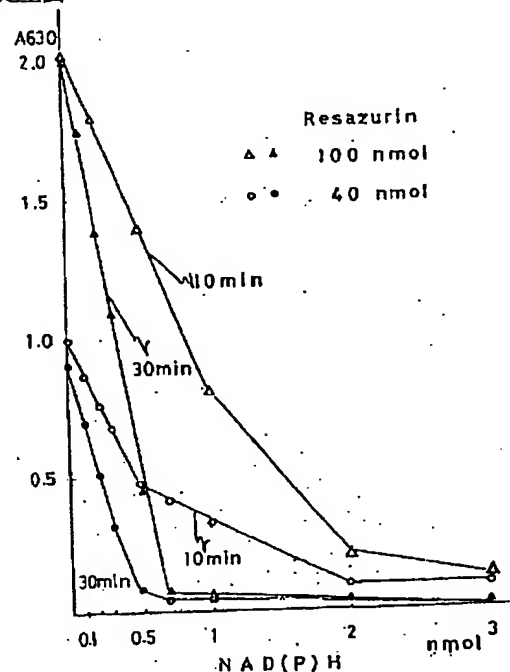
愛知県一宮市今伊勢町馬寄舟入1-1 コ
ーブ野村C棟1111号

(54)【発明の名称】 還元型及び酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型及び酸化型ニコチンアミ
ドアデニンジヌクレオチドリノ酸の微量定量法

(57)【要約】

【目的】還元型および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸の微量定量法に関する。

【構成】触媒の存在下NAD(P)HまたはNAD(P)を含む試料とレサズリンまたはp-ヨードニトロテトラゾリウムヴァイオレット(INT-V)を反応せしめて、それと共転するNAD(P)-NAD(P)Hサイクリングの基質と酵素系により増幅された可視部の吸光度の変化を測定することとを特徴とするNAD(P)HまたはNAD(P)またはそれに関連する酵素や基質または生成物の微量定量法。



THIS PAGE BLANK (USPTO)

【特許請求の範囲】

【請求項1】還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を補酵素とする生体中の酵素基質と酵素の共転反応系を用いて、反応後の未反応または残存ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸あるいは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸か、生成した還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸あるいはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸のいずれかを完全に分解させた後に、この試料とレサズリンまたはp-ヨードニトロテトラゾリウムヴァイオレットの色素をデア

フォラーゼの触媒の存在下で反応せしめ、更にアルコール脱水素酵素の触媒とアルコールの様にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを補酵素とする系またはグルコース6リン酸脱水素酵素の触媒とグルコース6リン酸の様にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸を補

酵素とする系によりサイクリングをすることにより増幅され感度を高めて生じた可視部に於ける吸光度の変化を測定することを特徴とする還元型および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸の微量定量法。

【請求項2】レサズリンに由来する600~630nmに於ける吸光度の変化を測定する請求項1記載の微量定量法。

【請求項3】反応により生成したレゾルフィンに由来する550nmに於ける吸光度の変化を測定する請求項1記載の微量定量法。

【請求項4】反応により生成したp-ヨードニトロテトラゾリウムフォルマザンに由来する492nmに於ける吸光度の変化を測定する請求項1記載の微量定量法。

【請求項5】触媒がデアフォラーゼやN-メチルフェナジンメトサルフェートである請求項1記載の微量定量法。

【請求項6】マイクロプレート方式の分光光度計を用いて吸光度を測定する請求項1記載の微量定量法。

【請求項7】反応後の未反応のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸をpH12~13附近にて60℃放置で分解後、目的のpHに調節してサイクリングによる増幅で感度を高める請求項1記載の微量定量法。

【請求項8】反応後に生成した還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸をpH1~2付近にて室温または37℃で分解後、目的のpHに調節してサイクリングによる増幅で感度を高める請求項1記載の微量定量法。

【請求項9】請求項1記載の生体中の酵素基質が、ガラ

クトース（ガラクトース-1-リン酸も含む）、フェニルアラニン、ロイシン、（バリン、イソロイシンも含む）、乳酸、アルコール類、リンゴ酸、グルタミン酸、グルコース-6-リン酸、6-ホスホグルコン酸、 α -グリセロリン酸、グリセロール、ピロリン-5'-カルボン酸などを測定する請求項1記載の微量定量法。

【請求項10】請求項1記載の生体中の酵素が、ガラクトース脱水素酵素、フェニルアラニン脱水素酵素、ロイシン脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素（ADH）、リンゴ酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素、 α -グリセロリン酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、ピロリン-5'-カルボン酸還元酵素などを測定する請求項1記載の微量定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は還元型および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型および酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸（以下これらをNAD(P)HおよびNAD(P)という）の微量定量法に関し、さらに詳しくは触媒の存在下NAD(P)Hを含む試料とレサズリンまたはp-ヨードニトロテトラゾリウムヴァイオレット（INT-V）を反応せしめて、それと共転するNAD(P)-NAD(P)Hサイクリングの基質と酵素系により増幅された可視部の吸光度の変化を測定することを特徴とするNAD(P)Hまたはそれに関連する酵素や基質または生成物の微量定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来のNAD(P)Hを定量する方法は、（1）それ自身の有する紫外部の吸収または蛍光を測定する方法、（2）ジアホラーゼ（DA）の存在下NAD(P)HとMTTやニトロブルーなどのテトラゾリウム化合物の色原体を反応せしめてホルマザン色素に導き、その可視部の吸収を測定する方法および（3）触媒の存在下NAD(P)Hとレサズリンの反応によって生成したレゾルフィンの蛍光を測定する方法（メソッズ イン エンザイモロジ（Meth. Enzymol.）第41巻、53-56頁、1975年）が知られている。

【0003】上記紫外部の吸収を測定する方法は、血清などの生体体液を試料とする場合は共存する紫外部に吸収をゆうする物質によって妨害をうけることおよび感度が低いという欠点があり、また蛍光を測定する方法は測定感度が高いにもかかわらず、蛍光光度計が高価で一般的に普及していないため採用されていない。

【0004】また上記ホルマザン色素を測定する方法は該色素が難溶性であるため光度計のセルやチューブに付着することおよび測定感度が低いという欠点がある。

【0005】NAD(P)Hは脱水素酵素および還元酵素の補酵素であり、生体体液中に存在するこれら酵素の測定ま

THIS PAGE BLANK (USPTO)

たはこれら酵素の基質となる生体体液中の成分の定量の際に、酵素反応によって生じたNAD(P)Hの変化が測定されるが、通常の比色法では感度が低い。

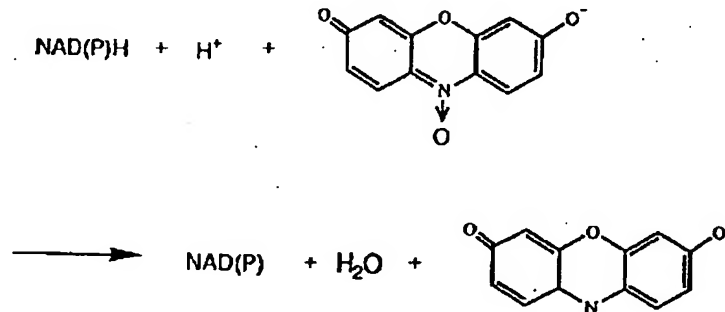
【0006】現在、生体体液中の成分の定量には酸化酵素を用いる方法がもっぱら利用されているが、この方法は試料中に共存するアスコルビン酸、ビリルビンなどの還元性物質による妨害を受けやすいという欠点がある。

【0007】脱水素酵素または還元酵素を用いる方法はこのような還元性物質による影響を受けにくい有利な方法であるが、前記した理由によりあまり利用されていないのが実状である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は前記した従来のNAD(P)Hの定量に於ける欠点を改良した、簡便で高感度な微量定量法を提供することを目的とする。

【0009】



【0012】またINT-Vもレサズリンに比べ感度は低いと同様に使用出来、そのホルマゼンの492nmの吸収を測定する。本発明のNAD(P)HおよびNAD(P)の感度はマイクロプレートを使用すれば、さらに高められる。

【0013】本発明によるNAD(P)HおよびNAD(P)の定量はNAD(P)HおよびNAD(P)を補酵素とする酸化還元酵素の活性の測定または該酵素を用いた基質の測定に利用することができる。

【0014】このような酸化還元酵素の例としては、ガラクトース脱水酵素、フェニルアラニン脱水酵素、ロイシン脱水酵素、乳酸脱水酵素、アルコール脱水酵素(ADH)、リンゴ酸脱水酵素、グルタミン酸脱水酵素、グルコース-6-リン酸脱水酵素、 α -グリセロリン酸脱水酵素、グリセロール脱水酵素、ピロリン-5-カルボン酸還元酵素などが挙げられ、請求項1記載の基質と酵素とに制限を受けない。

【0015】

【実施例】

実施例1 レサズリンによるNAD(P)Hの定量

レサズリン40または100nmol、DA(ペーリンガー製)20または60 μ l、ADH(オリエンタル酵母製)16.6mU、8%エタノール10 μ l、0.3Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を含む250 μ lの反応液を標準試料のNAD(P)Hを0.1、0.2、

*【課題を解決するための手段】本発明者はNAD(P)HおよびNAD(P)の定量法に関して、実用的に有利な発色色素を利用する手段がないかと鋭意研究した結果、触媒の存在下NAD(P)Hとレサズリンからレゾルフィンを生成せしめる反応に於いて、レサズリンおよびレゾルフィンが可視部の特定の波長に吸収極大を有するという性質を利用してNAD(P)Hを定量する方法を見出した。

【0010】即ち、レサズリンは微アルカリ性側で600nm附近に吸収極大を有する青色物質であり、一方レゾルフィンは570nm附近に吸収極大を有する赤色物質であるから、それぞれの吸収極大附近の波長における吸光度を測定することによりNAD(P)Hが定量される。NAD(P)Hとレサズリンの反応式を次にしめす。

【0011】

【化1】

※0.3、0.5、0.7、1、2、3nmolを入れたマイクロプレートに加えて、37 $^{\circ}$ C、10または30分間反応後停止液として10mM Cu^{++} 溶液10 μ l加えてマイクロプレート方式の分光光度計(コロナ電気製MTP-32型)を使って反応液の630nmまたは550nmに於ける吸光度を測定した結果の検量線を図1に示す。

【0016】上記の標準試料に代えて濃度未知の試料を用いて上記と同様の操作を行ない得られた吸光度を図1の検量線と対比して試料中のNAD(P)Hを定量出来る。

【0017】実施例2 INT-VによるNAD(P)Hの定量 INT-V 40または400nmol、DA 200mU、ADH 16.6U、0.8%エタノール10 μ lを含む130 μ lを試料のNAD(P)H 0.1、0.3、0.5、1、2、3、5nmolを入れたマイクロプレートに加えて、37 $^{\circ}$ C、10分反応後停止液10mM Cu^{++} 溶液10 μ l添加後マイクロプレートリーダー(東洋ソーダ製MPR-A4)を用いて反応液の492~415nmの吸光度を測定した結果の検量線が図2である。

【0018】上記の標準試料に代えて濃度未知の試料で同様の操作を行ない、得られた吸光度を上記検量線と対比することにより試料中のNAD(P)Hが定量される。

【0019】実施例3 ガラクトースとガラクトース1リン酸の定量

ガラクトースまたはガラクトース1リン酸を含む標準血液

THIS PAGE BLANK (USPTO)

汚紙(2、4、6、8、10、16、20mg/dl) 3mm径1個をマイクロプレートの中で色素固定後、下記の反応液30μlを入れ37℃、1時間反応する。I液(NAD 100nmol、アルカリフォスファターゼ 200mU、βガラクトース脱水素酵素 25mUの0.02M トリス塩酸緩衝液)、II液(I液からアルカリフォスファターゼを除く)、III液(I液からβガラクトース脱水素酵素を除く)を目的に応じて使用する。

【0020】反応後0.02M トリス塩酸緩衝液(pH8.0) 70μlを入れ混合して、その80μlを測定用のマイクロプレートに分注し、1N NaOH 10μlを加えプレートにシールを貼り60℃、15分放置後、3N HClと1Mトリス塩酸緩衝液(pH8) 70μlで中和し、レサズリン100nmol、ADH 16.6U、DA 60mU、8%エタノール10μl 総量220μlを加えて37℃、30分反応後停止液10μlで反応を止め、630nmの吸光度を測定した結果を図3に示す。

【0021】未知濃度の試料を上記と同様に操作し検量線と対比して求めるが、その時ガラクトース1 100nmolはI液-II液から、ガラクトースはII液-III液からその濃度を計算することが出来る。また上記の反応系のレサズリンだけをINT-V 40nmolにすると図3の検量線になる。

【0022】実施例4 フェニルアラニンの定量
マイクロプレート中にフェニルアラニンを含む標準血液汚紙(2、4、6、8、12、20mg/dl) ディスク3mm径1個を入れ、0.3Nトリクロル酢酸50μlを加えて、10分間混合した後、NAD 33mg、フェニルアラニン脱水素酵素(チバコーニング製) 33U/mlの150μlを含む0.2M グリシンKCl-KOH緩衝液(pH10.4) 16ml溶液の150μlを添加して37℃、1時間反応後その内の100μlを測定用マイクロプレートに分注し、1N NaOH 15μlを入れて、シールを貼り、60℃、15分放置後中和し、INT-V 40nmol、ADH 16.6U、DA 200mU、8%エタノール10μl 総量230μlで反応させ10分後に停止液10μlを加えて492~415nmの吸光度を測定した結果が図3の検量線である。

【0023】未知濃度の試料は上記と同様の操作を行ない検量線と対比して求めることが出来る。

【0024】実施例5 蛍光および比色に及ぼすNAD(P)濃度の影響[NAD(P)Hの酸分解法における]

ガラクトース16mg/dl血液ディスク3mm径1個[色素固定法で処理:特許出願番号昭和57年特許願第149466号:血液成分の測定法]、NAD 1~9nmol、β-ガラクトース脱水素酵素 25mU、0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH8) 20μlを含む30μlの二系列を37℃、1時間反応させ、一方には蒸留水200μlをいれ混合しその200μlをストリップウエルに移しコロナ蛍光光度計(MTP100型)によりEx 360nm、Em450nmで測定した。

【0025】他方には上記緩衝液70μlを加え混合し、

その80μlを測定用マイクロプレートに移し、その中に1N HCl 10μlをいれ室温または37℃、10~15分放置しNADHを分解し、1M 同緩衝液(pH8) 20μlで中和後、その中にレサズリン100または150nmol 10μl、8%エタノール10μl、ADH 16.6U 10μl、DA 2~6mU 10μlを加え37℃、30~60分後に停止液10mM Cu⁺⁺10μlをいれて東洋ソーダ製プレートリーダーの620nm/415nmで測定し、ガラクトース0mg/dlまたはblankをゼロ補正して計算する。

【0026】その結果蛍光ではNAD 3nmolまではNAD量に比例しそれ以上は一定の蛍光量となる(図4の上)。しかし比色ではレサズリン150nmolでNAD 2.6nmolが、レサズリン100nmolではNAD 2nmolで最大吸収となる(図4の中と下)。

【0027】実施例6 NADH分解法によるガラクトースの定量

ガラクトースを含む標準血液汚紙(2、4、6、8、10、16、20mg/dl) 3mm径1個をマイクロプレートにいれ、実施例5と同様に色素固定後、NAD 2.0、2.4、2.6、3.0nmol以外は実施例5と同じ条件で反応させ測定した。

【0028】その結果NAD 2.6nmolが最も感度が高く、ガラクトース0~20mg/dlで1.8 ODあり、また0~10mg/dlで1.1 ODとNAD分解法より高感度である。NAD 2.4と3.0nmolはやや感度がおちるが同じレベルであった。未知試料を上記標準試料と同様の操作を行い、得られた吸光度を上記検量線と対比することにより試料中のガラクトース量を定量する。

【0029】

【発明の効果】本発明による可視吸光度計を用いる簡便な方法により微量で高感度なNAD(P)HおよびNAD(P)の定量が可能と成った。また、本発明の波及効果として、試料中に共存する還元性物質による妨害を受けにくいこの補酵素の関与する酸化還元酵素の測定法または該酵素を用いる生体液成分の微量定量法が確立された。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるレサズリンによるNAD(P)Hの微量定量に於ける検量線である。

【図2】本発明のINT-VによるNAD(P)Hの微量定量に於ける検量線である。

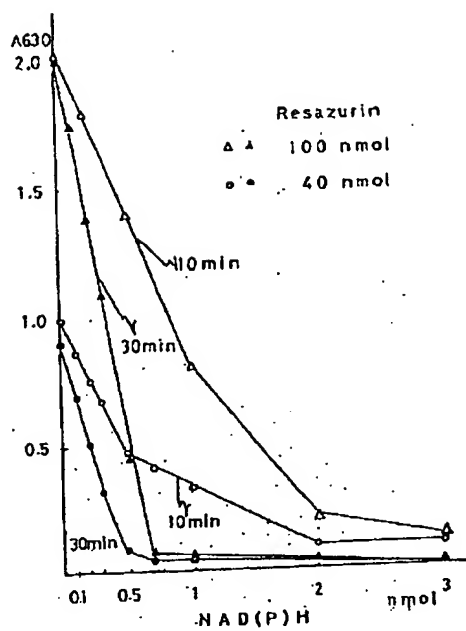
【図3】本発明のNAD(P)Hの定量法を利用したガラクトース及びガラクトース1 100nmolの定量に於けるレサズリンとINT-Vを用いた時の検量線及び本発明のNAD(P)Hの定量法を利用したフェニルアラニンの定量に於ける検量線を示す図である。

【図4】NAD(P)濃度と生成蛍光量及びNAD(P)H酸分解法による比色法の吸光度を示す図である。

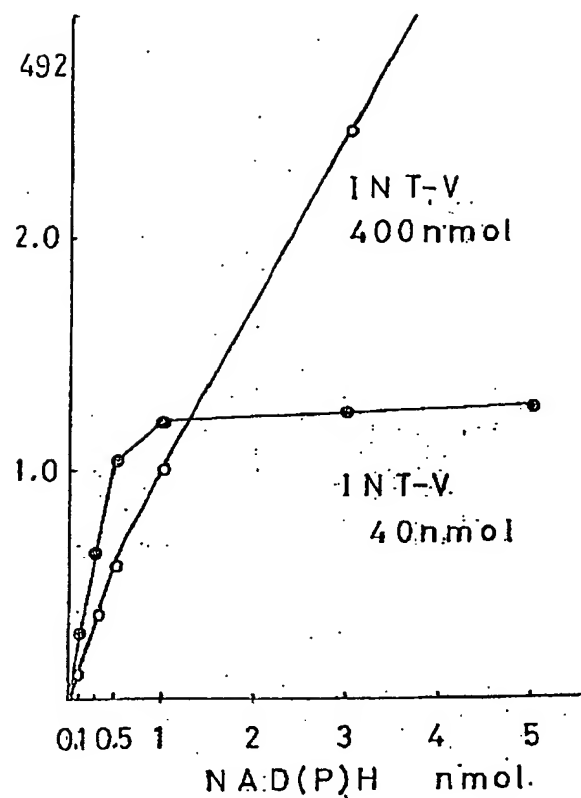
【図5】NADH酸分解法によるガラクトースの検量線を示す図である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

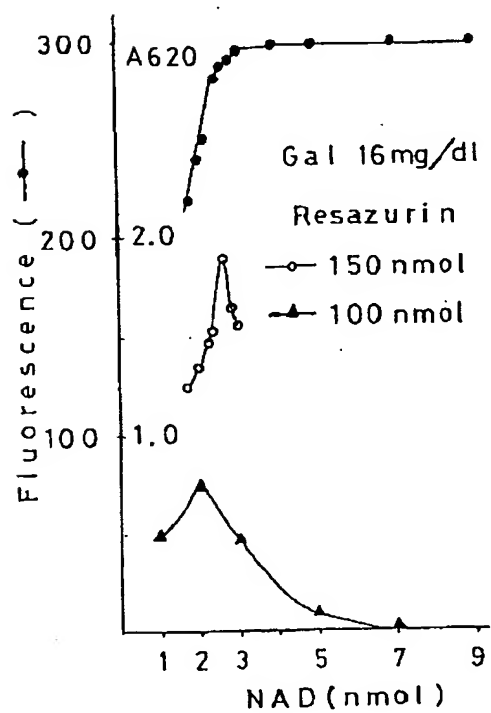
【図1】



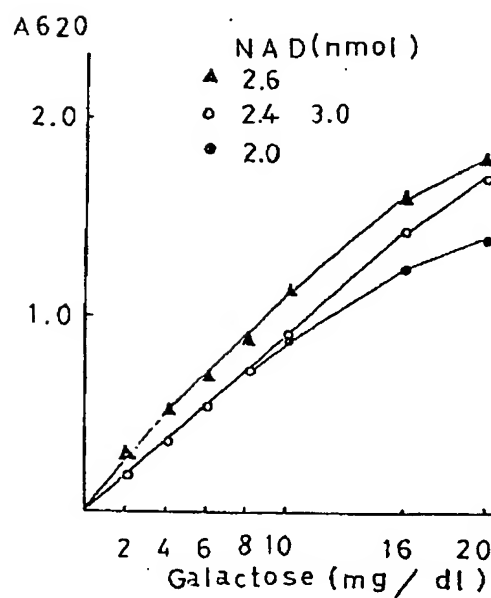
【図2】



【図4】

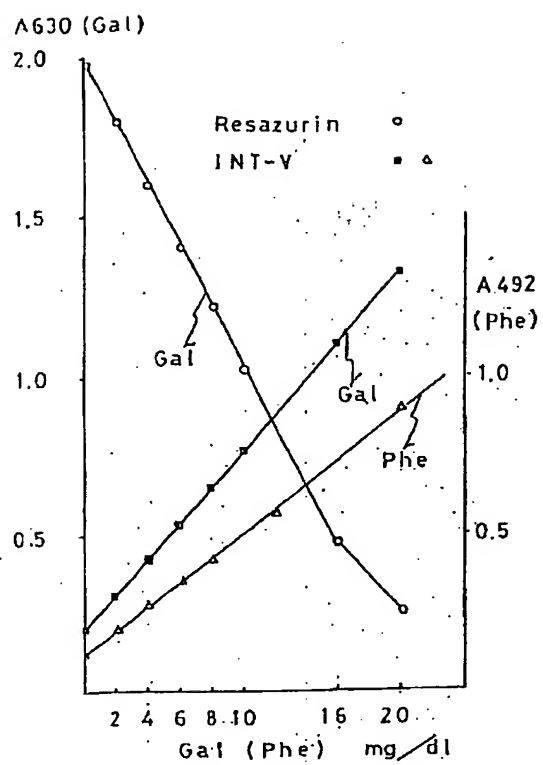


【図5】



THIS PAGE BLANK (USPTO)

【図3】



THIS PAGE BLANK (USPTO)